12 月 December
2020, 63(12): 1508 – 1515
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.12.009

薜荔榕小蜂幼虫虫龄的划分

包甜甜[1], 陈友铃[1], 吴文珊[1,*], 吴婷婷[1], 张兴坦[2], 周莲香[3]

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350117;
2. 福建农林大学海峡联合研究院基因组与生物技术中心, 福州 350002;
3. 台湾大学生态学与演化生物学研究所, 台北 10617)

摘要:【目的】薜荔 *Ficus pumila*. var. *pumila* 既是热带和亚热带植物生态系统的关键树种,也是城市垂直绿化的重要树种。薜荔榕小蜂 *Wiebesia pumilae* 是薜荔的专性传粉蜂。榕小蜂幼虫长期生活于隐头花序内的虫瘿中,虫体小,龄期长,观测困难。本研究旨在建立榕小蜂幼虫虫龄的划分标准,探讨确定隐蔽性昆虫幼虫龄数和龄期的可靠方法。【方法】共采集 447 头不同龄期的薜荔榕小蜂幼虫,对幼虫头壳宽、第 3 节宽、体长和周长 4 个形态指标进行测量,利用频次分布法确定幼虫龄数,并用众数龄期测定法计算各龄幼虫的龄期。【结果】幼虫头壳宽、第 3 节宽、体长和周长的频次分布均呈 5 个峰,表明幼虫发育龄数为 5 龄。因第 3 节宽的变异系数大于 20%,不适合作为虫龄划分的指标。回归分析表明幼虫头壳宽、体长和周长的测量值与虫龄之间均呈极显著正相关性($P<0.01$),由于体长测量值与虫龄回归曲线的判定系数(R^2)最高,因此体长为分龄的最佳测量指标,其回归方程为 $y=0.14e^{0.55x}$($P<0.01$, $R^2=0.97$)。夏季薜荔榕小蜂 1–5 龄幼虫的龄期分别为 4.29, 13.19, 6.27, 24.46 和 8.90 d,总幼虫期为 57.11 d。【结论】本研究明确了薜荔榕小蜂幼虫的龄数和龄期,并筛选出榕小蜂幼虫最佳分龄指标,为榕小蜂发育以及榕-蜂协同进化研究奠定基础。

关键词: 薜荔榕小蜂; 传粉蜂; 幼虫; 头壳宽; 体长; 频次分布法

中图分类号: Q968　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)12-1508-08

Division of larval instars of *Wiebesia pumilae* (Hymenoptera: Agaonidae)

BAO Tian-Tian[1], CHEN You-Ling[1], WU Wen-Shan[1,*], WU Ting-Ting[1], ZHANG Xing-Tan[2], CHOU Lien-Siang[3] (1. Provincial Key Laboratory for Developmental Biology and Neurosciences, College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China; 2. Center for Genomics and Biotechnology, Haixia Institute of Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Institute of Ecology and Evolutionary Biology, College of Life Science, Taiwan University, Taipei 10617, China)

Abstract:【Aim】*Ficus pumila*. var. *pumila* is not only a key tree species of tropical and subtropical plant ecosystems, but also an important tree species of urban vertical greening. *Wiebesia pumilae* is the obligate pollinator of *F. pumila* var. *pumila*. Fig wasp larvae live in the gall of syconium for a long time, with special features of small body, long stadium, and difficulty for observation. The purpose of this study is to establish the classification criteria of larval instars of fig wasps, and to explore a reliable method for determining the number and stadia of larval instars of recessive insect larvae.【Methods】A total of 447 larvae of *W. pumilae* at different developmental stages were collected, and the morphological indicators including head capsule width, width of the 3rd segment, body length and girth were measured. The larval instars were determined by frequency distribution method, and the larval stadia were calculated by the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670431, 31270440); 福建省自然科学基金项目(2020J01179)
作者简介: 包甜甜, 女, 1994 年 12 月生, 内蒙古通辽市人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫发育学, E-mail: 1540383199@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuwenshan@126.com
收稿日期 Received: 2020-04-23; 接受日期 Accepted: 2020-05-27

population median stadium measurement method. 【Results】The frequency distribution of larval head capsule width, width of the 3rd segment, body length and girth all showed five peaks, suggesting that there are five larval instars. Since the coefficient of variation in the width of the 3rd segment was greater than 20%, it was not suitable as the index of instar division. Regression analysis showed that the head capsule width, body length and girth were extremely significantly correlated with the larval instars ($P<0.01$). Because the coefficient of determination (R^2) of regression curve for body length measurement and larval instars was the highest, the body length was the optimal measurement index of instars, and the regression equation was $y=0.14e^{0.55x}$ ($P<0.01$, $R^2=0.97$). The stadia of the 1st-5th instar larva of *W. pumilae* was 4.29, 13.19, 6.27, 24.46 and 8.90 d, respectively, and the total larval stadium was 57.11 d.【Conclusion】This study determined the number and stadia of larval instars of *W. pumilae* and screened out the optimal age index of larval fig wasps, providing a foundation for studying fig-wasp co-evolution.

Key words: *Wiebesia pumilae*; pollinator; larva; head capsule width; body length; frequency distribution method

昆虫幼虫虫龄划分是昆虫发育生物学的重要内容，对昆虫种群年龄结构和发生时间动态的研究至关重要。虫龄划分包括龄数和龄期的确定，最直接的方法是通过观察幼虫蜕皮次数确定龄数，两次蜕皮之间的时间为龄期，但是这种方法仅适于生长周期短（一般仅为 1 个月左右），体型较大（蜕皮现象直观），易采样或可室内饲养的昆虫；对于幼虫期发育期长、体型小、生活场所隐蔽，室内又无法培养的昆虫幼虫，其虫龄划分则是基于 Dyar 法则（相邻虫龄幼虫的虫体的某个部位呈几何级数增长）测量虫体某个外部形态指标（Dyar and Rhinebeck, 1890），通过频次分布法分析幼虫发育增长规律进而确定虫龄，并依据 Brooks（1886）、Floater（1996）和 Crosby（1973）生长法则辅助推断。基于测量的精确性，测量指标首选幼虫骨化程度较高的部位，例如头壳、口钩和头咽骨（胡陇生等, 2012；贺春玲等, 2015；Shi *et al*., 2017）等，基于测量的便利性则选择体长、体宽和周长等作为测量指标（宗世祥等, 2006；万喻等, 2015；曹鹏等, 2018）。

薜荔 *Ficus pumila* var. *pumila* 为桑科（Moraceae）榕属 *Ficus* 攀援藤本植物，广布于我国长江以南各省区，是热带和亚热带植物生态系统的关键树种，其瘦果水洗可作凉粉，根茎叶均可入药。薜荔耐贫瘠，抗干旱，不定根发达，攀缘及生存适应能力强，是城市垂直绿化的重要树种。薜荔依赖膜翅目（Hymenoptera）榕小蜂科（Agaonidae）的薜荔榕小蜂 *Wiebesia pumilae* 为其传粉，二者维持着长期稳定的互利共生关系（Chen *et al*., 2016）。虫龄划分是榕小蜂发生规律、生物学特性以及榕-蜂共生研究的基础，但由于榕小蜂的整个幼虫期都在榕果封闭的环境中度过，蜕皮难以观察，幼虫体长仅数十至数百微米，且无法室内培养，因此，目前关于榕小蜂的分龄方法和分龄标准的研究尚无人报道，均是依据幼虫形态特征的差异进行分龄：Jansen-González 和 Sarmiento（2008）将榕树 *Ficus andicola* 的传粉榕小蜂 *Pegoscapus bacataensis* 幼虫发育分为 5 龄；Jia 等（2014）也将对叶榕 *F. hispida* 的传粉榕小蜂 *Ceratosolen solmsi* 幼虫发育分为 5 龄；但 Yadav 和 Borges（2017）将聚果榕 *F. racemosa* 3 种非传粉榕小蜂 *Sycophaga testacea*、*Apocrypta* sp. 2 和 *Apocrypta westwoodi* 幼虫发育划分为 4 龄。Jansen-González 等（2012, 2014）虽利用频次分布法确定了榕树 *F. citrifolia* 的传粉蜂 *Pegoscapus* sp. 幼虫发育为 4 龄，以及非传粉蜂 *Idarnes flavicollis* 幼虫发育为 3 龄，但仅作为附录发表，没有虫龄划分过程的具体描述。综上所述，关于榕小蜂幼虫发育相关的研究结果少，依据形态特征进行划分的榕小蜂虫龄较为混乱，本研究旨在以头壳宽、第 3 节宽、体长和周长为测量指标，运用统计分析方法确定传粉榕小蜂幼虫的龄数和龄期，建立榕小蜂幼虫虫龄划分的方法和标准，为榕小蜂发育研究，以及榕-蜂协同进化研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2018 年 7 月 8 日在福建省福州市森林公园（26°15′N, 119°29′E）对薜荔幼果（直径 1.5 cm）进

行标记,并用尼龙网袋罩住以防止其他小蜂或昆虫进入薜荔果内干扰实验,待果实散发芳香气味,打开网袋放入小蜂,标记有小蜂进入的榕果,2 d 后开始采样,采样时间从 2018 年 7 月 10 日至 9 月 10 日。每间隔 3 d 采集 5 个已被产卵的薜荔榕果,带回实验室,插水培养。

1.2 室内解剖及测量

对半切开薜荔榕果,置于 SMZ745T 解剖镜下将虫瘿取出,用昆虫针将虫瘿划开,取出小蜂,置于载玻片上,在 Olympus SZ61 体视显微镜下观察、并利用 SteREO Lumar V12 成像系统拍照,再用 Image-Proplus 5.1 显微测量系统对每头小蜂幼虫的头壳宽、第 3 节宽、体长和周长 4 项指标分别进行测量(图 1)。共测量幼虫 447 头。

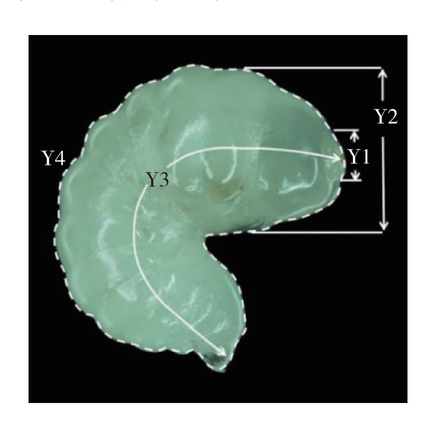


图 1 薜荔榕小蜂幼虫测量示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the measurements for *Wiebesia pumilae* larva

Y1: 头壳宽 Head capsule width; Y2: 第 3 节宽 Width of the 3rd segment; Y3: 体长 Body length; Y4: 周长 Girth.

1.3 数据分析

依据 Brooks-Dyar 规则(Brooks, 1886; Dyar and Rhinebeck, 1890),利用 SPSS 21.0 统计软件对薜荔榕小蜂幼虫的头壳宽、第 3 节宽、体长、周长等测量指标进行频次分布分析,并绘制相应的频次分布图,再依据测量结果计算小蜂各龄幼虫 4 项形态结构指标的平均值($\overline{X}$)、标准误差(SD)、变化幅度及变异系数,通过变异系数(变异系数应小于 20%)、Brooks 指数(即 Brooks 指数值应在 1.4 ~ 2.2)、Crosby 指数(Crosby 指数大于 10% 时,划分的龄期数不合理)等指标验证幼虫分龄的合理性,结合线性回归,以及对测量值进行 LSD 多重比较差异显著度分析,筛选分龄最合适的形态特征指标。变异系数、Brooks 指数和 Crosby 指数公式计算如下:

变异系数 $= SD_n/\overline{X}_n$(其中 SD_n 和 $\overline{X}_n$ 分别表示 n 龄幼虫各测量指标的标准差和平均值);

Brooks 指数 $= \overline{X}_n/\overline{X}_{n-1}$(其中 $\overline{X}_n$ 和 $\overline{X}_{n-1}$ 分别表示 n 龄和 $n-1$ 龄幼虫各个测量指标的平均值);

Crosby 指数 $= (B_n - B_{n-1})/B_{n-1}$(其中 B_n 和 B_{n-1} 分别表示第 n 和 $n-1$ 个 Brooks 指数)。

在确定龄数后,参考众数龄期测定法(戴志一, 1980; Caltagirone *et al.*, 1983; 王小艺等, 2005)确定薜荔榕小蜂各龄的龄期。

2 结果

2.1 薜荔榕小蜂幼虫的龄数

对 447 头薜荔榕小蜂幼虫头壳宽、第 3 节宽、体长和周长 4 项指标的测量值进行频次分布的统计分析,结果表明,4 项指标的频次分布均相对集中在 5 个区域:头壳宽的 5 个峰值分别在 0.04, 0.07, 0.12, 0.19 和 0.27 mm 左右(图 2: A);第 3 节宽的 5 个峰值分别在 0.12, 0.25, 0.40, 0.67 和 0.85 mm 左右(图 2: B);体长的 5 个峰值分别在 0.24, 0.42, 0.79, 1.31 和 2.09 mm 左右(图 2: C);周长的 5 个峰值分别在 0.56, 1.01, 1.90, 3.03 和 4.49 mm(图 2: D)。由此,根据 Dyar 法则可以断定,薜荔蜂幼虫的龄数为 5 龄。薜荔榕小蜂幼虫 4 项分龄指标的均值、标准误差、变化幅度和变异系数见表 1。头壳宽、体长及周长这 3 项指标在薜荔榕小蜂不同虫龄之间的平均值具有显著差异($P < 0.05$),且变异系数均小于 20%, Crosby 指数均小于 10%,表明将薜荔榕小蜂幼虫分为 5 龄是合理的。头壳宽、体长和周长是比较理想的分龄指标;第 3 节宽由于其 Crosby 指数均大于 10% 且变异系数大于 20%,因此不适合作为薜荔榕小蜂幼虫虫龄划分的指标。

2.2 分龄指标测量值与虫龄之间的相关性

对薜荔榕小蜂幼虫的头壳宽、体长和周长 3 项分龄指标的各龄测量值与相应龄期之间进行回归分析(图 3),结果表明,3 项指标与虫龄之间均符合 Dyar 法则所描述的指数关系,且各分龄指标测量值与虫龄之间均呈极显著正相关($P < 0.01$),体长测量值与虫龄回归曲线的判定系数(R^2)最高。因此,体长为分龄的最佳测量指标,同时也进一步表明薜荔榕小蜂幼虫龄数划分为 5 龄是准确的。

2.3 薜荔榕小蜂幼虫各龄龄期

确定了薜荔榕小蜂幼虫的龄数后,进一步统计各龄幼虫不同日期出现数量及对应的累积百分比,将百分数转化为机值(概率单位,即表2回归方程

图 2　薜荔榕小蜂各龄幼虫频次分布图

Fig. 2　Frequency histograms of *Wiebesia pumilae* larvae

A：头壳宽 Head capsule width；B：第 3 节宽 Width of the 3rd segment；C：体长 Body length；D：周长 Girth.

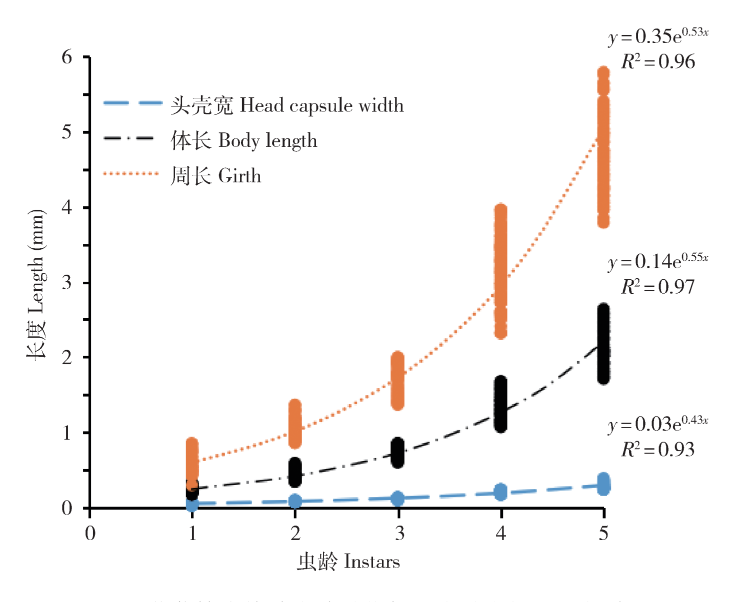


图 3　薜荔榕小蜂幼虫分龄指标和虫龄之间的回归关系

Fig. 3　Regression relationship between morphological variables and instars of *Wiebesia pumilae* larvae

表 1 薜荔榕小蜂幼虫各分龄指标的测量结果

Table 1 Measurement results of variables separating larval instars of *Wiebesia pumilae*

形态指标 Morphological variable	幼虫虫龄 Larval instars	样本数 Sample size	变幅(μm) Range	平均值 ± *SE* $\overline{X} \pm SE$	标准差 *SD*	变异系数(%) Coefficient of variation	Brooks 指数 Brooks' ratio	Crosby 指数 Crosby's ratio
头壳宽 Head capsule width	1 龄 1st instar	46	39.08 – 43.73	41.41 ± 1.15 e	7.827	18.84	–	–
	2 龄 2nd instar	109	70.70 – 74.68	72.69 ± 1.01 d	10.49	14.43	1.76	–
	3 龄 3rd instar	88	113.49 – 119.55	116.52 ± 1.52 c	14.30	12.27	1.60	–0.09
	4 龄 4th instar	103	180.51 – 188.56	184.53 ± 2.03 b	20.58	11.14	1.58	–0.01
	5 龄 5th instar	101	261.09 – 278.00	269.55 ± 4.26 a	42.84	15.90	1.46	–0.08
第 3 节宽 Width of the 3rd segment	1 龄 1st instar	100	117.32 – 129.51	123.41 ± 3.07 e	30.70	24.88	–	–
	2 龄 2nd instar	96	242.69 – 260.87	251.78 ± 4.58 d	44.88	17.83	2.04	–
	3 龄 3rd instar	97	386.04 – 407.21	396.63 ± 5.33 c	52.52	13.24	1.58	–0.23
	4 龄 4th instar	78	658.70 – 681.23	669.96 ± 5.66 b	49.96	7.46	1.69	0.07
	5 龄 5th instar	76	833.41 – 871.43	852.42 ± 9.54 a	83.18	9.76	1.27	–0.25
体长 Body length	1 龄 1st instar	97	231.74 – 251.00	241.37 ± 4.85 e	47.80	19.80	–	–
	2 龄 2nd instar	71	405.93 – 437.75	421.84 ± 7.98 d	67.22	15.94	1.75	–
	3 龄 3rd instar	89	765.50 – 806.09	785.79 ± 10.21 c	96.35	12.26	1.86	0.07
	4 龄 4th instar	114	1 269.10 – 1 344.05	1 306.58 ± 18.92 b	201.97	15.46	1.66	–0.11
	5 龄 5th instar	76	2 037.03 – 2 150.09	2 093.56 ± 28.38 a	247.38	11.82	1.60	–0.04
周长 Girth	1 龄 1st instar	86	539.28 – 583.86	561.57 ± 11.21 e	103.96	18.41	–	–
	2 龄 2nd instar	83	980.60 – 1 045.34	1 012.97 ± 16.27 d	148.25	14.64	1.79	–
	3 龄 3rd instar	98	1 842.43 – 1 948.87	1 895.65 ± 26.82 c	265.45	14.00	1.87	0.04
	4 龄 4th instar	82	2 952.44 – 3 107.86	3 030.15 ± 39.06 b	353.66	11.67	1.60	–0.15
	5 龄 5th instar	98	4 365.55 – 4 609.58	4 487.56 ± 61.48 a	608.60	13.56	1.48	–0.07

表中同一栏内同一指标数据后不同字母表示经多重比较(LSD)在5%水平上具有显著差异。Different letters following the data of the same variable within the same column indicate significant difference between instars based on LSD at the 5% level.

中的 y)，以机值作为纵坐标(为避免种群中两端极端数字影响，采用发育进度 12.5% ~87.5% 之间的数值)，调查日期作横坐标(表 2 回归方程中的 x 设 2018 年 8 月 4 日等于 1)，进行线性回归分析，计算出各龄的回归方程式 $y = a + bx$。以机值 5(发育进度 =50%)为代表，两虫龄直线间的横坐标距离，即代表该虫龄的众数龄期(表 2)。薜荔榕小蜂夏季 1 -5 龄幼虫(图 4)的龄期(L_1 - L_5)分别为 4.29，13.19，6.27，24.46 和 8.90 d，总幼虫期为 57.11 d (表 2)。

表 2　薜荔榕小蜂各龄幼虫的龄期计算

Table 2　Larval stadia of *Wiebesia pumilae*

发育阶段 Developmental stage	回归方程 Regression equation	相关系数 r Correlation coefficient	F 值 F-value	显著水平 Significance level	发育中值 Median development value	75% 置信限 75% Confident limit	众数龄期(d) Population median stadium
1 龄 1st instar	$y_1 = 7.82 + 0.14x_1$	0.99	1 656.44	$P < 0.0001$	-19.70	-27.98 - 11.45	$L_1 = 4.29$
2 龄 2nd instar	$y_2 = 7.46 + 0.16x_2$	0.98	657.61	$P < 0.0001$	-15.41	-22.35 - 8.47	$L_2 = 13.19$
3 龄 3rd instar	$y_3 = 5.23 + 0.10x_3$	0.91	164.57	$P < 0.0001$	-2.21	-13.26 - 8.84	$L_3 = 6.27$
4 龄 4th instar	$y_4 = 4.03 + 0.24x_3$	0.99	7 996.97	$P < 0.0001$	4.06	-0.63 - 8.73	$L_4 = 24.46$
5 龄 5th instar	$y_5 = -3.31 + 0.29x_5$	0.99	498.65	$P < 0.0001$	28.53	24.36 - 32.79	$L_5 = 8.90$
总幼虫龄期 Total larval stadium	$y_6 = -8.94 + 0.37x_6$	0.95	18.41	$P < 0.001$	37.43	32.73 - 42.13	$L = 57.11$

L_1 - L_5：分别为 1 -5 龄幼虫的龄期 Stadia of the 1st -5th instar larva, respectively; L：总幼虫龄期 Total larval stadium.

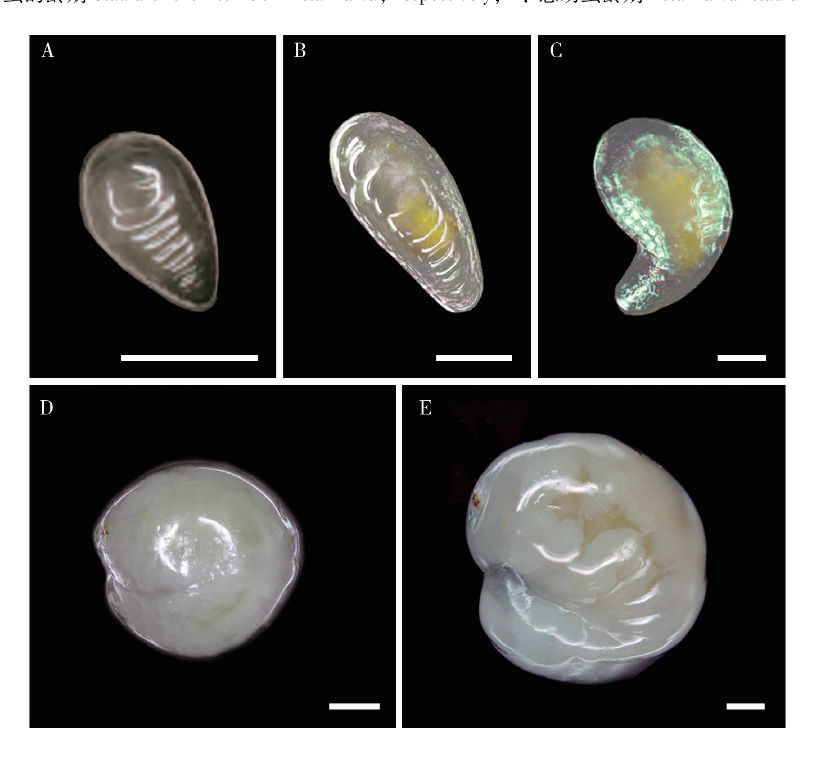


图 4　薜荔榕小蜂各龄幼虫

Fig. 4　Larvae of various instars of *Wiebesia pumilae*

A：1 龄幼虫 1st instar larva；B：2 龄幼虫 2nd instar larva；C：3 龄幼虫 3rd instar larva；D：4 龄幼虫 4th instar larva；E：5 龄幼虫 5th instar larva. 根据各虫龄体长均值挑选榕小蜂幼虫拍照。Larvae were selected based on the body length of different instars and photographed. 标尺 Scale bars = 0.2 mm.

3　讨论

3.1　榕小蜂幼虫最适分龄指标

由于绝大多数昆虫幼虫的头壳骨化程度高，各龄幼虫头壳宽不同，而同龄幼虫头壳宽大致固定，因此在昆虫幼虫虫龄划分的研究中，头壳宽是最常用的划分指标(贺春铃等，2015；万喻等，2015；Luo *et al.*，2016；Go *et al.*，2019)，但薜荔榕小蜂幼虫微小，1 -3 龄幼虫的头壳宽多小于 0.1 mm(且骨化程度不高)，只能通过幼虫活体拍照后对照片进行测

量;拍摄角度不同易造成测量误差,同时,口器运动和头部内缩均影响头壳宽测量的准确性;头壳宽值比体长和周长小得多,因此相同的标准差,头壳宽的变异系数(标准差/平均值)较大,易导致分龄的偏差。本研究同时测量幼虫头壳宽、第3节宽、体长和周长4项指标,并经综合分析,筛选出体长是划分薜荔榕小蜂幼虫虫龄最佳的测量指标。

3.2 榕小蜂幼虫虫龄难以划分的原因

遵循 Dyar 法则,昆虫幼虫相邻两个龄期某一部位的长、宽度存在一定的几何级数关系,那么依据该部位测量值进行频次分布分析,其频次分布图中的一个频次分布集中区域即代表一个龄期(Hammack *et al.*, 2003; Calvo and Molina, 2008; 杨美红等, 2012; Cazado *et al.*, 2014)。然而,薜荔榕小蜂以头壳宽、体长和周长的测量值建立的频次分布均无明显的分布聚集区(即无间隔聚集分布),只能依据波峰与波谷的分布规律,将连续的分布区分出5个区间,代表5龄(图2),并应用 Brooks 指数、Crosby 指数验证分龄的合理性,其中1龄与2龄幼虫之间的区分尤为困难,其中原因有:(1)低龄期幼虫极其微小(μm 级),小到几乎进入显微镜的测量误差范围,从而造成了测量值的高标准差;(2)无法收集在完全相同条件下生长的幼虫。由于榕小蜂无法人工饲养,我们只能从同一天放蜂的不同的榕果中收集幼虫,果间幼虫种群发育差异可能是导致不同龄期幼虫分龄指标测量值交叠的主要原因;(3)1龄幼虫龄期最短,导致1龄和2龄幼虫分龄指标测量值交叠严重,极易造成龄数的误判,即将5龄误判为4龄。本研究结果表明以体长为测量指标,利用频次分布法能够确定榕小蜂幼虫的龄数,以众数龄期测定法能够确定榕小蜂幼虫的龄期。

3.3 薜荔榕小蜂龄期的变化

福建地区的薜荔榕小蜂通常一年产卵2次,春季通常在4月初产卵,产卵时间相对集中,该批次小蜂既为雌花传粉,也繁育后代,发育期约3~4个月;秋季小蜂产卵以繁育后代为主,产卵时间分散在7-10月间,于当年年末或翌年出飞,发育期短者4~5个月,长者达8个月(罗光坦等, 2000; Yang *et al.*, 2017),实验室长期观察数据表明:秋季小蜂发育的幼虫期和蛹期均比春夏季长,由此可见,幼虫的龄期极易随物候发生变化,在水热条件较好的春夏季幼虫龄期较短,而在寒冷干燥的秋冬季幼虫龄期较长,同理,幼虫龄期在不同地理位置、不同海拔高度也将发生变化,在后续研究中,我们将进一步关注榕小蜂幼虫龄期变化的规律性。

参考文献(References)

Brooks WK, 1886. Report on the Stomatopoda collected by H. M. S. Challenger during the Years 1873-1876. Neill and Co., London. 5, 105.

Caltagirone LE, Getz W, Meals DW, 1983. Head capsule width as an index of age in larvae of navel orangeworm, *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environ. Entomol.*, 12(1): 219-221.

Calvo D, Molina JM, 2008. Head capsule width and instar determination for larvae of *Streblote panda* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 101(5): 881-886.

Cao P, Yang XL, Wu WY, Wang Y, Wei BQ, 2019. The preliminary study on the ontogeny of *Tsunyiella luna* from the Cambrian Niutitang Formation in Songlin Town, Zunyi County, Guizhou Province. *Acta Palaeontol. Sin.*, 58(2): 152-162. [曹鹏, 杨兴莲, 吴维义, 王圆, 魏步青, 2019. 贵州遵义松林寒武系牛蹄塘组 *Tsunyiella luna* 的个体发育初探. 古生物学报, 58(2): 152-162]

Cazado LE, van Nieuwenhove GA, O'Brien CW, Gastaminza1 GA, Murúa MG, 2014. Determination of number of instars of *Rhyssomatus subtilis* (Coleoptera: Curculionidae) based on head capsule widths. *Fla. Entomol.*, 97(2): 639-643.

Chen YL, Huang ML, Wu WS, Wang AF, Bao TT, Zheng CF, Chou LS, Tzeng HY, Tu SW, 2016. The floral scent of *Ficus pumila* var. *pumila* and its effect on the choosing behavior of pollinating wasps of *Wiebesia pumilae*. *Acta Ecol. Sin.*, 36(5): 321-326.

Crosby TK, 1973. Dyar's rule predated by Brooks' rule. *N. Z. Entomol.*, 5(2): 175-176.

Dai ZY, 1980. Determination of mode stadia of insect larvae. *Entomol. Knowl.*, 17(4): 185-187. [戴志一, 1980. 昆虫幼虫种群众数龄期的测定法. 昆虫知识, 17(4): 185-187]

Dyar HG, Rhinebeck NY, 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche*, 5: 420-422.

Floater GJ, 1996. The Brooks-Dyar rule and morphometrics of the processionary caterpillar *Ochrogaster lunifer* Herrich-Schaffer (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Aust. J. Entomol.*, 35(3): 271-278.

Go MS, Kwon SH, Kim SB, Kim DS, 2019. The developmental characteristics for the head capsule width of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae and determination of the number of instars. *J. Insect Sci.*, 19(1): 1-9.

Hammack L, Ellsbury MM, Roehrdanz RL, Pikul JLJr, 2003. Larval sampling and instar determination in field populations of northern and western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 96(4): 1153-1159.

He CL, Cao L, Li M, 2015. Division of larval instars of *Xylocopa tranquebarorum*. *J. Environ. Entomol.*, 37(1): 128-132. [贺春玲, 曹磊, 李梦, 2015. 长木蜂幼虫龄期的划分. 环境昆虫学报, 37(1): 128-132]

Hu LS, Qi CJ, Zhu YF, Tian CM, Ren L, 2012. Determination on larva instars of ber fruit fly. *J. Xinjiang Agric. Univ.*, 35(2): 137-

139.［胡陇生，齐长江，朱银飞，田呈明，任玲，2012. 枣实蝇幼虫龄期的测定. 新疆农业大学学报，35(2)：137 – 139］

Jansen-González S, Sarmiento CE, 2008. A new species of high mountain Andean fig wasp (Hymenoptera: Agaonidae) with a detailed description of its life cycle. *Symbiosis*, 45(1 – 3): 135 – 141.

Jansen-González S, Teixeira SDP, Pereira RAS, 2012. Mutualism from the inside: coordinated development of plant and insect in an active pollinating fig wasp. *Arthropod-Plant Int.*, 6(4): 601 – 609.

Jansen-González S, Teixeira SDP, Kjellberg F, Pereira RAS, 2014. Same but different: larval development and gall-inducing process of a non-pollinating fig wasp compared to that of pollinating fig-wasps. *Acta Oecol.*, 57(3): 44 – 50.

Jia LY, Xiao JH, Niu LM, Ma GC, Fu YG, Dunn DW, Huang DW, 2014. Delimitation and description of the immature stages of a pollinating fig wasp, *Ceratosolen solmsi marchali* Mayr (Hymenoptera: Agaonidae). *Bull. Entomol. Res.*, 104(2): 164 – 175.

Luo GT, Li HQ, Ma WL, Chen Y, 2000. The cooperation of life-stage between *Wiebesia pumilae* (Hill) Wieb. (Agaoindae) and *Ficus pumila* L. (Moraceae). *Chin. J. Ecol.*, 19(3): 73 – 75.［罗光坦，李宏庆，马炜梁，陈勇，2000. 薜荔榕小蜂与薜荔生活期的配合. 生态学杂志，19(3)：73 – 75］

Luo W, Ji YC, Wen JB, 2016. Application of a frequency distribution method for determining instars of *Eucryptorrhynchus brandti* (Coleoptera: Curculionidae) from several morphological variables. *Biocontrol Sci. Technol.*, 26(10): 1329 – 1336.

Shi Y, Wang L, Dou W, Wei DD, 2017. Determination of instars of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.*, 100(2): 270 – 275.

Wan Y, Liu TH, Wang JJ, He YZ, 2015. Identification of the larval instars of the *Depressaria falkovitshi* Lvovsky (Lepidoptera: Elachistidae: Depressariinae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(6): 1491 – 1495.［万喻，刘廷辉，王静静，何运转，2015. 法氏柴胡宽蛾幼虫龄期的划分. 应用昆虫学报，52(6)：1491 – 1495］

Wang XY, Yang ZQ, Liu GJ, Liu ES, 2005. Larval instars and stadia of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Sci. Silv. Sin.*, 41(3): 97 – 102.［王小艺，杨忠岐，刘桂军，刘恩山，2005. 白蜡窄吉丁幼虫的龄数和龄期测定. 林业科学，41(3)：97 – 102］

Yadav P, Borges RM, 2018. Host-parasitoid development and survival strategies in a non-pollinating fig wasp community. *Acta Oecol.*, 90: 60 – 68.

Yang MH, Zhang JT, Zong SX, Luo YQ, Niu HL, 2012. Determination of the larval instar number of the carpenter moth *Holcocerus vicarius* (Lepidoptera: Cossidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(6): 710 – 718.［杨美红，张金桐，宗世祥，骆有庆，牛辉林，2012. 榆木蠹蛾幼虫龄数的确定. 昆虫学报，55(6)：710 – 718］

Yang S, Chen YL, Wu WS, Wang AF, Chen XJ, Bao TT, Ye JF, Song TY, Wu YL, Chou LS, Tzeng HY, 2017. Behavioral responses of *Wiebesia pumilae* to the female phase fig volatiles of *Ficus pumila* L. var. *pumila* and *Ficus pumila* L. var. *awkeotsang*. *Acta Ecol. Sin.*, 37(21): 7161 – 7169.

Zong SX, Luo YQ, Xu ZC, Wang T, 2006. Preliminary study on different larval instars of seabuckthorn carpenter moth *Holcocerus hippophaecolus*. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(5): 626 – 631.［宗世祥，骆有庆，许志春，王涛，2006. 沙棘木蠹蛾幼虫龄期的初步研究. 昆虫知识，43(5)：626 – 631］

（责任编辑：赵利辉）